LA SECRECION CUTANEA, INSTRUMENTO SISTEMATICO

Doctora Bobbie S. Low

British Columbia University.

SUMMARY

The Author points out information lacking in morphological Systematics for evolutionary studies of amphibian taxa, relieving physiological and biochemical analysis as valuable tools of philogenetic interrelationships study.

After a brief mention of *Urodela* cutaneous secretion, with polypeptides hormone-like structured as chief constituent, and some steroid anuran toxic samples, there is an explanation about chromatographic isolation of indole derivatives.

An important conclusion is the participation of 5-hydroxitryptamine in almost all *Bufo* species cutaneous secretion more concentrated when the species is more primitive; chemical affinities are represented by polygonal graphs; high affinity indexes seem to suggest us remote dispersions in early evolution stages; these affinities are more common between African and Tropical American Species, whereas Middle East and African *Bufonidae* show a low toxic affinity; Asian *Bufonidae* are not much analogous in cutaneous secretion composition with New World and African specimens.

Actually, chemical analysis suggests some generalizations about philogenetic interrelationships and primitive spreading of early evolution specimens of anura.

Es sabido que la investigación sobre las relaciones entre animales, para ser provechosa, debe basarse en la mayor diversidad de datos que se

puedan obtener dentro del mayor número posible de sistemas biológicos. Sabemos que la selección no actúa con la misma intensidad en todos los sistemas, sabemos también que una valoración filogenética puede hacerse sólo cuando las discrepancias revelan diferencias genéticas. Mayr (1964) ha demostrado los peligros de la confusión que puede originar por convergencias y paralelismos.

Tradicionalmente, la investigación sistemática se ha basado, por la mayor parte, en rasgos morfológicos. Al otro extremo, algunos investigadores han propuesto cambios taxonómicos basados solo en datos químicos (Manske, 1955). Desde luego, esta manera de considerar el problema es tan arbitraria como la morfológica. Por ejemplo, usando este método en la clasificación del género *Bufo*, se pudiera clasificarlo en el orden botánico de las *Ranales* dada la presencia de ciertos indoles alcaloides y particularmente la bufotenina en ambos (Alston y Turner, 1963).

En el estudio de orden sistemático de los anfibios, ciertos métodos no morfológicos son muy provechosos. A. P. Blair (1942) ha analizado varios mecanismos de comportamiento que aíslan varias especies. W. F. Blair (1956a, b) ha estudiado el papel diferenciador del canto nupcial como mecanismo de aislamiento, y ha revisado el uso de criterios no morfológicos (1962); Bertini y Cei (1962) y Betini y Rathe (1962) han analizado las hemoglobinas y seroproteínas como instrumento sistemático. Para estudiar la hibridización y para demostrar las relaciones Moore (1952) y Volpe (1952) han usado criterios de fisiología.

Uno de los instrumentos no morfológicos es el de la secreción cutánea de los anfibios. La secreción se obtiene fácilmente en la mayoría de los casos. Se ha comprobado que en el género *Bufo*, ésta es un factor genético (Hunsaker y otros, 1960; Wittliff, 1962; Low, 1967) y podemos suponer que éste es el caso de otros anfibios también. Los componentes principales de la secreción son productos del metabolismo secundario. Así que no son controlados en el mismo grado por la selección natural como es el caso de las hemoglobinas; en su mayor parte las hemoglobinas son importantes en cuanto a problemas de nivel ordinal, pero dentro de una sola familia o de un solo género, son ineficaces, salvo excepciones importantes. Los metabolitos secundarios, de otra parte, son menos estables desde el punto de vista evolutivo, y son útiles en los niveles taxonómicos más bajos, pero no lo son en los niveles más altos; también son útiles en problemas de hibridación y polimorfismo. El uso de un tejido único dentro de un limitado marco taxonómico, reduce la probabilidad de errores de convergencia. En el caso de los indoles o de las aminas biogenéticas es frecuentemente posible determinar el sistema enzimático, como han demostrado Cei, Erspamer y Roseghini (1968). Si se pueden identificar positivamente los compuestos, esto ayuda mucho. Sin embargo, en la mayoría de los

estudios sistemáticos o de problemas, especímenes individuales son necesarios y no queda bastante material para un análisis químico. Han comprobado Alston y Turner en su obra sobre la sistemática bioquímica, que los compuestos presentes representan una importante fuente de variación para comparaciones sistemáticas aún sin la identificación, puesto que se halla comprobada la presencia o la ausencia de los compuestos.

Son muchos los métodos de que disponemos para los estudios bioquímicos, y la elección de un método dependerá de la clase de los compuestos presentes: los más comunes son la cromatografía de capa delgada, de columna, o de papel, y la electroforesis, o una combinación de algunos de éstos.

Un método de gran utilidad es el de la cromatografía bidimensional de papel con uso en secuencia de reactivos selectivos de coloración: como puede verse en la fig. 1 si se escogen cuidadosamente los sistemas solventes y los reactivos de tinte, se puede ganar mucha más información sobre los compuestos desconocidos que del uso de la cromatografía en una sola dimensión. Esto es especialmente importante cuando la cantidad disponible es demasiado pequeña para permitir una serie de análisis químicos.

Es importante dar énfasis al hecho de que nuestros conocimientos son incompletos; hay muchos problemas interesantes por examinar ya que frecuentemente aun cuando existen numerosos datos que tratan de la química de la secreción cutánea no se han considerado desde el punto de vista de su implicación sistemática. Este es el caso de la familia *Bufonidae*. La toxina contiene muchos elementos farmacológicos incluso los indoles, alcaloides no indoles, y las bufadienolidas. Dada la faceta farmacológica del problema, hace tiempo que la toxina se ha estudiado químicamente. Una serie de trabajos de Chen y Chen (1933 a - h) y otros son ejemplos de este aspecto. Sólo recientemente científicos como Hunsaker y otros (1960); Cei y Erspamer (1966); Cei, Erspamer y Roseghini (1967, 1968); Low (1967, 1968); Porter (1964) y Wittliff (1964) han considerado las implicaciones sistemáticas del problema. En la mayoría de los grupos anfibios, el trabajo sistemático queda por hacer.

Repasemos pues las técnicas bioquímicas en las secreciones cutáneas de los anfibios, los métodos y la importancia de las observaciones hechas en términos de la evolución de los grupos *APODA o GIMNOPHIONA*.

Se sabe muy poco acerca de la secreción cutánea del orden ápoda y su importancia. De Lille (1934) y Sawaya (1940) han investigado los componentes de la secreción pero no se conoce ninguna investigación posterior en este campo.

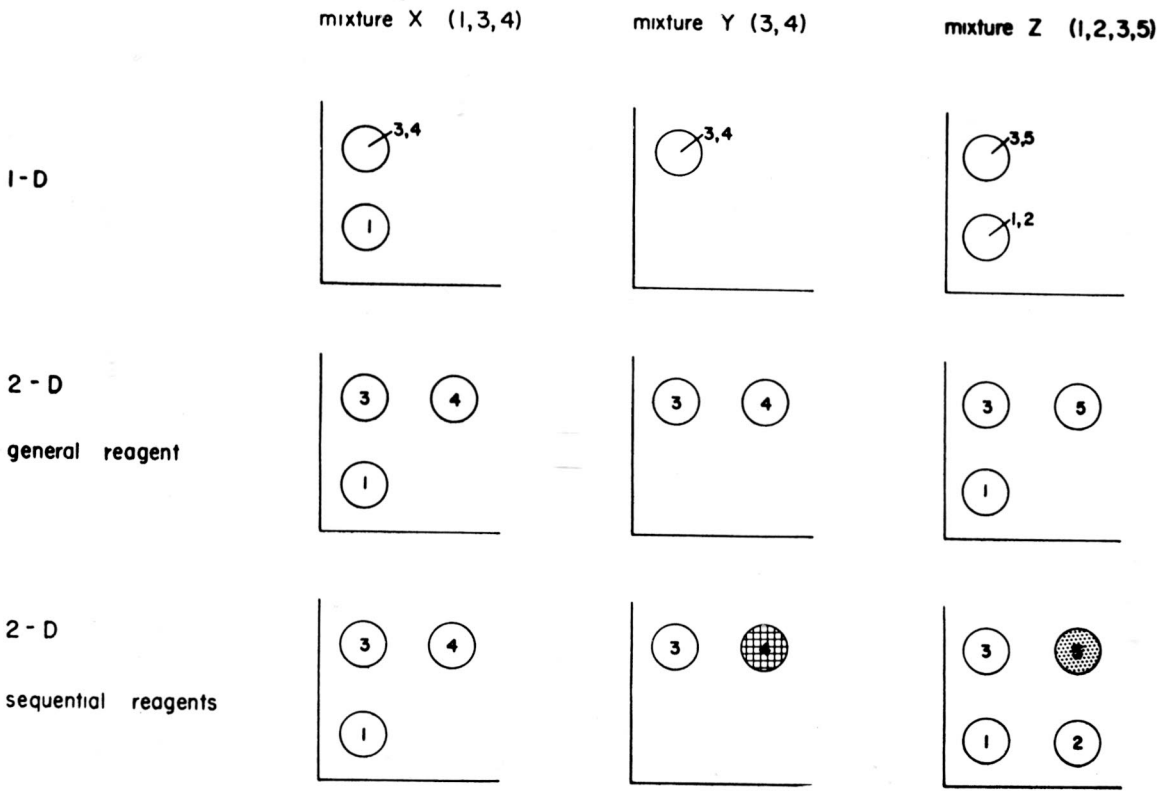
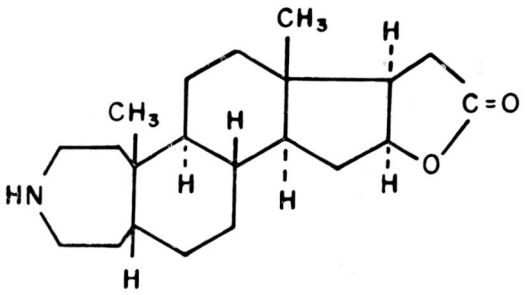


FIGURA 1. Diagrama que muestra las ventajas posibles de la cromatografía bidimensional.

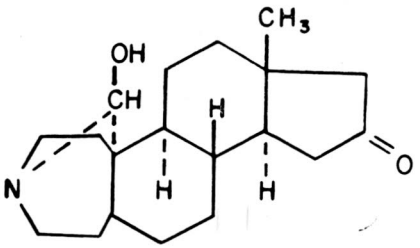
URODELA

En el orden *Urodela*, la mayor parte de los experimentos se han hecho sobre los géneros *Salamandra* y *Taricha*. En la secreción del género *Salamandra* los componentes principales son los derivados del Samandarín: Samandaridín y Cicloneosamandión (Fig. 2). Se ha demostrado que estos componentes tienen una acción convulsiva similar a la de la estricnina (Milch y Kaiser, 1963), la cual impide la transmisión desde las interneuronas inhibitorias (Curtis y de Groat, 1968). Milch y Kaiser (1963) aconsejan el método de extracción siguiente. La secreción se colecciona en una pipeta conectada a una bomba aspirante después de haber anestesiado los animales con dióxido de carbono. La toxina luego se extrae durante diez a catorce días a 37 grados centígrados con pepsina en forma de clorhidrato y después se lava con éter; se añade amoníaco y se lava de nuevo con éter. Samandarín y algunos de los alcaloides se disuelven en éter, mientras el cicloneosamandión se sedimenta y puede extraerse lavando el precipitado con cloroformo. Los componentes pueden separarse por el método cromatográfico usando papel Whatman número uno impregnado con fosfato de potasio (monobásico). Un solvente eficaz es el cloroformo: butanol: ciclohexano: ácido acético glacial en la proporción de 1:1:4:06. Schoepf y Miller (1960) aconsejan el reactivo subnitrato de bismuto para la identificación de los alcaloides de las salamandras. Dichos alcaloides otorgan un color anaranjado estable a este reactivo.

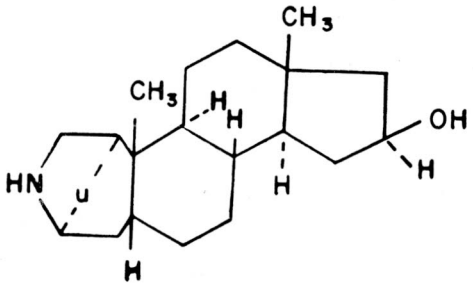
Los componentes activos de la secreción cutánea de *Taricha*, el Tritón norteamericano-occidental, se han extraído recientemente por Mosher y otros (Fig. 3). Es interesante notar que en la toxina del género *Taricha* (que se llama tetrodotoxina o tarichotoxina) el principio activo es idéntico a la toxina del pez erizo japonés *(Diodon* y *Tetrodon)*. Su acción consiste en inhibir al potasio y al sodio la permeabilidad transitoria de la membrana irritable y consecuentemente, bloquea el potencial de acción de las fibras nerviosas. Es una de las sustancias zoológicas más tóxicas que se conocen. La Dosis Letal Mínima en ratas consiste en ocho microgramos por gramo. Los tritones mismos son muy resistentes a la toxina. Hasta ahora, no se ha publicado un solo trabajo de orden sistemático sobre la toxina del género *Taricha;* lo único que se ha hecho es sobre la purificación y farmacología de la tetrodotoxina. Actualmente en la Universidad de Calgary, el doctor Benn trabaja sobre la toxina de las glándulas paratiroides del género *Amblystoma*. Esta investigación va encauzada hacia los efectos de esta toxina sobre los predadores.



SAMANDARIDIN



CYCLONEOSAMANDION



SAMANDARIN

FIGURA 2.

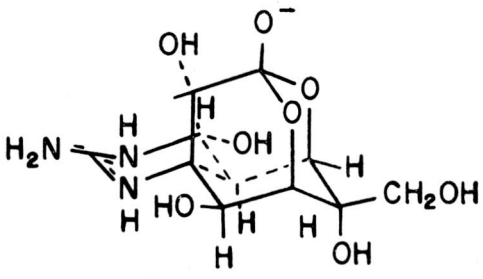


FIGURA 3. Fórmula estructural de tetrodotoxina o tarichotoxina.

ANURA

La subclase de los *Anura* se ha investigado más a fondo pero en este caso también sólo parte del trabajo va hacia la sistemática. Sin embargo, la experimentación no sistemática puede ser muy útil para resolver problemas de sistemática.

En la familia de los *Discoglossidae* se han hecho trabajos sobre los géneros *Discoglossus* y *Bombina*. Se sabe muy poco de los componentes de la secreción cutánea de *Discoglossus*, excepto que contiene 5-hidroxitriptamina, como la contiene la mayoría de los otros anfibios (Erspamer y Vialli, 1952; Michl y Kaiser, 1963). La secreción de *Bombina* tiene un marcado efecto hemolítico, y cuando se inyecta en el peritoneo, provoca parálisis. Además de una concentración muy alta de 5-hidroxitriptamina (cerca del 10%), (Michl y Kaiser, 1963) la toxina contiene un polipéptido de la estructura siguiente: (Kiss y Michl, 1962):

Ala - Glu - His - Phe - Ala - Asp $(NH_2)_2$

Según Kiss y Michl (1962), partes de la secuencia son idénticas con la hormona estimuladora de los melanóforos y con la hormona adrenocorticotrópica. Muy poco se sabe de la composición de las secreciones de *Xenopus* y *Pelobates* excepto que contienen 5-hidroxitriptamina (Michl y Kaiser, 1963).

El género *Dendrobates* sudamericano tiene una secreción cutánea extremadamente tóxica. Los principoos activos se han identificado como alcaloides de configuración molecular esteroide que actúa sobre las termi-

naciones nerviosas motrices (Daly y Myers 1967). La piel entera puede extraerse con una solución tampón llevada a pH 7.4 con metanol al 80 por ciento, y puede purificarse con una mezcla de solución 0.1 Normal de ácido clorhídrico y cloroformo. El concentrado se eleva a pH 9 y se extrae con cloroformo.

La familia *Hylidae* tiene una interesante serie de compuestos de secreción. Michl y Kaiser (1963) han descrito la actividad farmacológica de los varios componentes. Además de los indoles, o aminas biogenéticas, derivados de la histamina y una sustancia parecida a la bradiquinina en varias especies (Erspamer, Bertaccini y Cei 1962) las sustancias extraídas con metanol de la piel de *Hyla cerulea* contienen un decapéptido llamado ceruleína, que estimula los músculos lisos y estructuralmente se parece a la hormona gastrina (Fig. 4) (Anastasi, Erspamer y Endean 1968). La ceruleína o los polipéptidos similares a la ceruleína no se concentran sólo en esta especie y otras especies australianas del género *Hyla*, sino también en los géneros *Leptodactylus* y *Phyllomedusa* sudamericanos. Su importancia biológica y taxonómica no se conocen, pero se ha hecho bastante investigación bioquímica para permitir un estudio sistemático de estos polipéptidos.

La familia *Ranidae* posee una secreción que contiene 5-hidroxitriptamina y posiblemente algunos derivados de ésta (Erspamer, 1955), cierto número de aminoácidos libres (Kiss y Michl 1962), y en algunas especies como *Rana temporaria*, bradiquinina (Erspamer *et al.* 1962; Anastasi *et al.* 1968; Anastasi *et al.* 1965). En este caso, la separación de los componentes de la secreción se ha hecho principalmente por cromatografía con un solvente de butanol: ácido acético: agua (4:1:5).

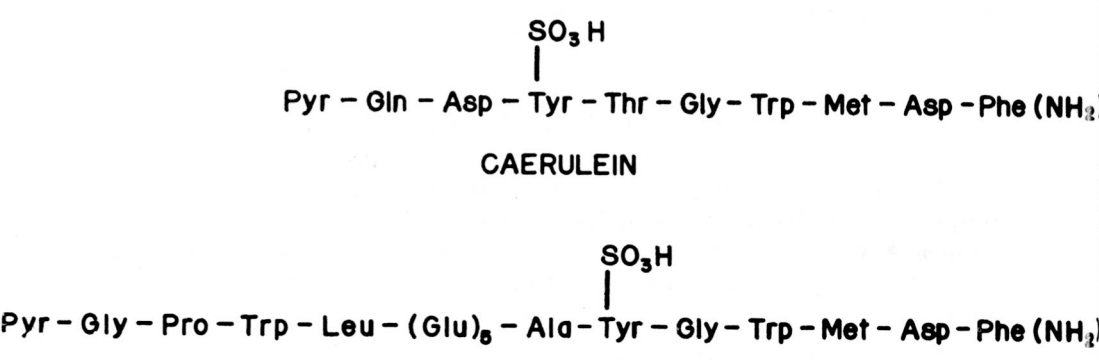
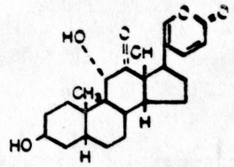
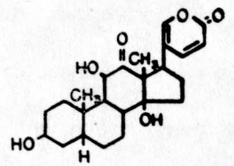


FIGURA 4. Secuencias de aminoácidos de la ceruleína y la gastrina humana II.

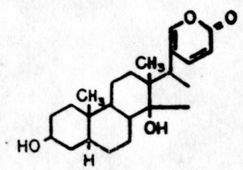
ARENBUFAGIN $C_{24}H_{32}O_6$ 1/



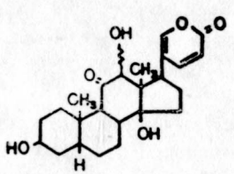
ARGENTINOGENIN $C_{24}H_{30}O_6$ 2/



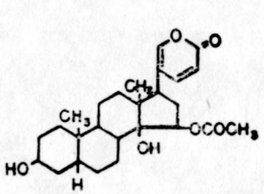
BUFALIN $C_{24}H_{34}O_4$ 3/15/



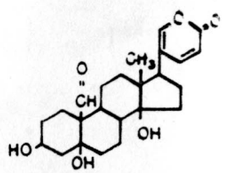
BUFARENOGEN $C_{24}H_{32}O_6$ 2/



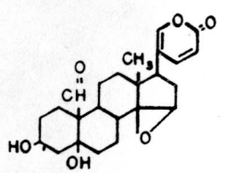
BUFOTALIN $C_{26}H_{36}O_6$ 4/



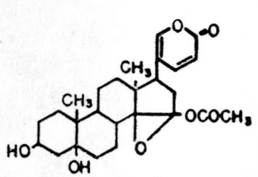
BUFOTALIDIN $C_{24}H_{32}O_6$ 5/



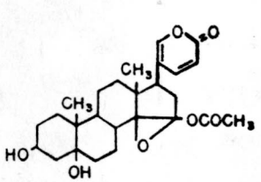
BUFOTALININ $C_{24}H_{30}O_6$ 6/7/



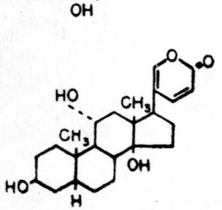
CINOBUFAGIN $C_{26}H_{34}O_6$ 8/



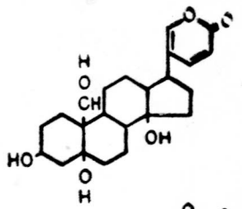
CINOBUFOTALIN $C_{26}H_{34}O_7$ 9/



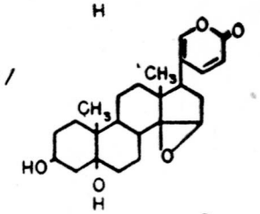
GAMABUFOTALIN $C_{24}H_{34}O_5$ 10/



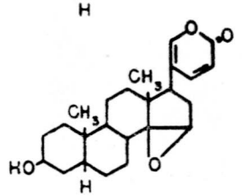
HELLEBRIGENOL $C_{24}H_{34}O_6$ 9/



MARINOBUFAGIN $C_{24}H_{32}O_3$ 11/12/



RESIBUFAGIN $C_{24}H_{32}O_4$ 13/



TELOCINOBUFAGIN $C_{24}H_{34}O_5$ 14/

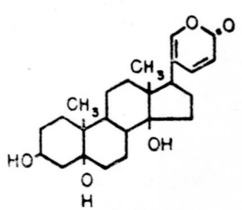


FIGURA 5. *Las bufadienolidas.* Fórmulas estructurales reportadas del análisis de la secreción parotoidal de varias especies de *Bufo*. Las referencias de las que se han tomado las fórmulas se encuentran en la lista siguiente.

1. Deulofeu, Duprat and Labriola (1940).
2. Rees, Schindler, Deulofeu and Reichstein (1959).
3. Kotake and Kuwada (1937).
4. Michl and Kaiser (1963).
5. Wieland and Hesse (1935); cited in Michl and Kaiser (1963).
6. Wieland, Hesse and Huttel (1936).
7. Wieland and Hesse (1935).
8. Kotake and Kuwada (1939).
9. Michl and Kaiser (1963).
10. Michl and Kaiser (1963).
11. Barbier *et al.* (1959).
12. Jensen and Evans (1934).
13. Linde and Meyer (1958).
14. Michl and Kaiser (1963).
15. Kotake and Kuwada (1942).

Las secreciones de la familia *Leptodactylidae*, que son tan numerosas en Sudamérica, interesan desde el punto de vista químico y sistemático. En general, las secreciones contienen 5-hidroxitriptamina, bufoteninas, bufotionina (Erspamer *et al.*, 1964), derivados de la histamina (Erspamer, Vialli *et al.*, 1964), y fisalamina (Michl y Kaiser 1963). Erspamer y Vialli (1952) encontraron también una fenilalquilamina que denominaron leptodactilina; Cei, Erspamer y Roseghini (1968), en su excelente trabajo han demostrado que la formación de las indolalquilaminas y los polipéptidos se relaciona muy bien con el esquema sistemático que se nota con los métodos morfológicos. En su trabajo, las pieles desecadas de los leptodactílidos se extrajeron con ochenta por ciento de metanol o setenta por ciento de acetona por una semana. Se decanta el material sobrenadante y las pieles se reconcentran durante una semana más. El concentrado se analiza por cromatografía en papel Whatman número uno en solvente de n-butanol ácido acético-agua en proporción de 4:1:5. Se usó el método monodimensional ascendente. Erspamer y Erspamer (1962) han descrito otros métodos.

Llegamos ahora a la familia *Bufonidae*. En esta familia, y particularmente en el género *Bufo*, tan común, se ha trabajado intensamente en el ramo de la sistemática Bioquímica. La toxina de los bufónidos aparentemente carece de los polipéptidos (Cei *et al.*, 1968b), pero es rica en pteridinas (Goto, 1963 a, b) esteroles (Michl y Kaiser, 1963), indoles, principalmente derivados de la triptamina (Cei *et al.*, 1968b), (Low, 1667, 1968). Cei, Erspamer y Roseghini (1968 b) han notado también en algunos casos la presencia de fenilalquilaminas, y rastros de cantidades mínimas de imidazolalquilaminas.

Reseñamos aquí el trabajo que se ha hecho con las bufadienolidas. Estos son esteroides glicósidos con una acción farmacológica parecida a la digitalina (Michl y Kaiser, 1963). Una serie de compuestos muy parecidos entre sí se encuentran en la toxina de todas las especies de *Bufo* examinadas hasta ahora (Fig. 5). Quisiera subrayar el hecho de que estos compuestos, aunque presentes en muchas especies, no parecen estar relacionados en su distribución con la posición sistemática de las especies dentro del género. Una lectura atenta de los trabajos que se han escrito sobre esta materia muestra la distribución de los compuestos dentro de este género (lista 1). Como se puede ver en los casos del *B. regularis* (africano) y del *B. melanostictus* (asiático) no hay correspondencia entre los especímenes. En efecto, si se calculan los coeficientes de afinidad basados en la semejanza de los compuestos de la toxina (Ellison *et al.*, 1962) se encuentra que varias especies no tienen casi ninguna correlación entre sí mismas (lista 2). Esto se puede explicar de varias maneras, por supuesto. Quizás la nomenclatura taxonómica sea incorrecta, o las especies polimórficas. Es posible que los compuestos no estén distribuídos y correlacionados con los rasgos evolutivos

de las especies. Este no parece ser el caso y por cierto sería un problema interesante por resolver para un sistemático. Si los compuestos no revelan correlación evolutiva, ¿cuáles factores ecológicos son significativos? ¿Cómo operan las fuerzas selectivas? Esta pudiera ser una zona fructuosa de investigación y por cierto, este ejemplo indica la necesidad de escoger y analizar con cuidado los problemas de esta clase para fines químicos, farmacológicos o sistemáticos.

Métodos Bioquímicos provechosos en el tratamiento de la secreción cutánea de los Bufonidae.

Los indoles y las aminas biogénicas que están relacionadas con ellos, tienen más correlación sistemática con la evolución de los *Bufonidae* que las bufadienolidas. Han sido importantes también para indicar nuevos problemas que no se notan en la investigación morfológica. Los trabajos de Wittliff (1962, 1964), Porter (1964) y Porter y Porter (1967) indican esto, y recientemente Cei y otros (1968) y Low (1967, 1968) han probado una marcada correlación entre la presencia de ciertas aminas y la evolución en otros sistemas del género *Bufo*. Las técnicas cromatográficas usadas por ambos investigadores eran parecidas. Cei y otros usaron el sistema monodimensional descrito para la familia de los *Leptodactylidae* y Low (1967) usó el sistema bidimensional descendiente. La primera dimensión solvente era butanol terciario: ácido acético glacial: agua (3:1:1); el segundo solvente era ocho por ciento de cloruro de sodio y ácido acético glacial (100:1). El segundo solvente era utilísimo para la separación de los indoles (Fig. 6). Cei y otros (1968b) hicieron cálculos semicuantitativos del material presente por unidad de peso de piel desecada. Pero usando sólo datos cualitativos pudieron mostrar correlaciones significativas con otros sistemas.

Mi investigación estriba en el porcentaje de ocurrencias de compuestos en los individuos examinados. En total, se obtuvieron mil cuatrocientos especímenes de secreciones glandulares de las parotoideas de sapos de 39 especies provenientes de ochenta y una localidades. Después del método cromatográfico, se usaron varios métodos de coloración en secuencia (Smith 1963), principalmente ninhidrina, reactivo de Ehrlich, verde de bromocresol y ácido sulfanílico. Además, para corroborar las pruebas, se usaron rodamina B, ninhidrina con ácido acético, y otras (Low 1967). Se hizo una identificación tentativa de los compuestos usando el método cromatográfico con compuestos conocidos e idénticos sistemas de solventes como referencia.

Para obtener un coeficiente de similaridad por comparaciones cuantitativas de poblaciones y especies, desarrollé una modificación del concepto

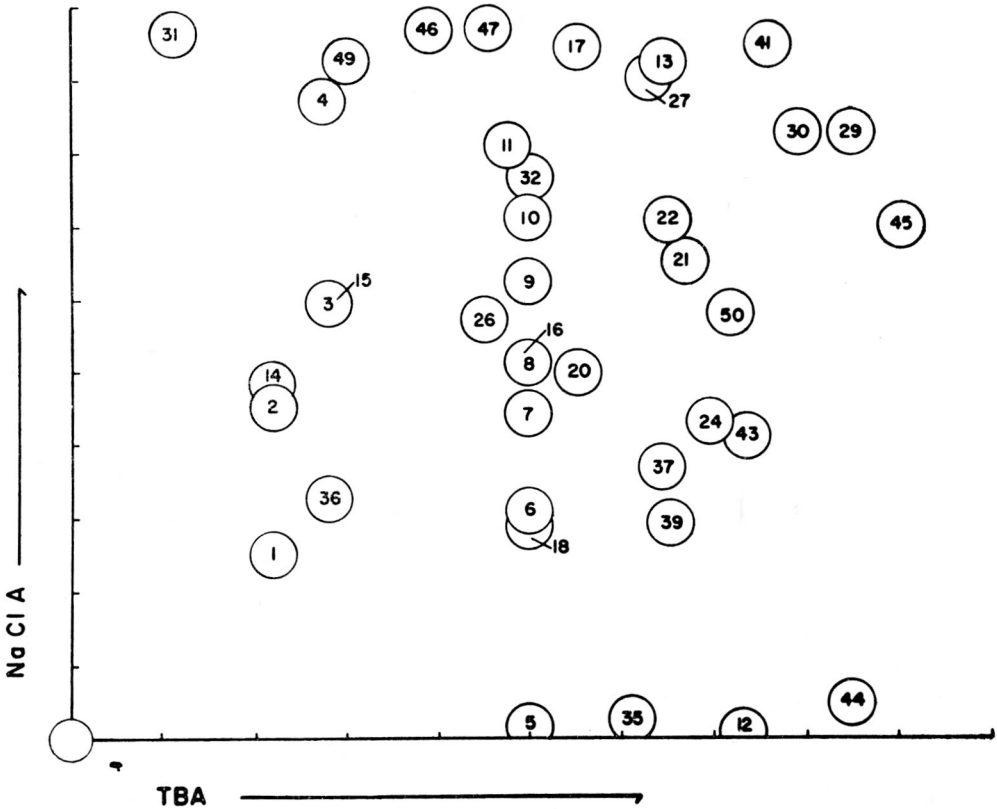


FIGURA 6. Diagrama de la distribución cromatográfica de los compuestos en la toxina de *Bufo*.

de afinidad por pares de Ellison, Alston y Turner (1963). Su concepto de afinidad por pares es útil cuando se comparan números de especímenes agrupados, es decir, cuando se juntan los especímenes de un número dado de individuos. Esto representa una relación de compuestos comparativos por cualquiera de las dos especies que se analizan y el número total de los compuestos presentes en las dos especies (Fig. 7). También indica la afinidad cromatográfica y probablemente la afinidad bioquímica de las dos especies. Si se pueden usar especímenes individuales, como en mi investigación, se puede juzgar el polimorfismo en la unidad de población o se pueden hacer comparaciones entre diferentes poblaciones. En tales casos, la afinidad basada en el porcentaje de cada población que tiene los varios compuestos, proporciona más informaciones que la afinidad fundada sólo en la presencia o ausencia de los compuestos. La afinidad en el porcentaje de población que posee los compuestos se calcula de la manera siguiente:

$$\frac{\text{número total de compuestos compartidos en las especies A y B}}{\text{número total de compuestos en A + de compuestos en B}}$$

$$\frac{\text{porcentaje total de las ocurrencias compartidas en las especies A y B}}{\text{porcentaje total de las ocurrencias en A + porcentaje total de las ocurrencias en B}}$$

FIGURA 7. Afinidad por pares y afinidad por ocurrencias basada en el porcentaje de población que poseen los compuestos.

Porcentaje total de frecuencias observadas en especies A y B.

% total de frecuencia observada en A + % total de frecuencia observada en B.

Esta relación se expresa mediante un porcentaje. El porcentaje de las frecuencias de los compuestos en una especie representa cuantitativamente el grado de polimorfismo de la toxina en esta especie. El porcentaje de las frecuencias puede representar el exacto porcentaje de cualquier compuesto en una población, o puede representar estadísticamente intervalos de clase para frecuencias porcentuales. En mi trabajo he usado cuatro intervalos de clase en cuanto a estas frecuencias. Desde luego, esto es arbitrario, pero he demostrado que la desviación es mínima (Low 1967), entre uno y tres por ciento en la mayoría de las poblaciones. En efecto, cuando se analizan menos de diez individuos para cada población, el uso de porcentajes exactos introduce un aspecto de falsa exactitud.

Se calcularon los coeficientes de afinidad con un computador IBM y los resultados se pudieron usar para un análisis en el programa TAXON, de computador. Empero, Porter y Porter (1967) han demostrado que la variación en los resultados de agrupación que se refieren a los datos bioquímicos en *Bufo* depende mucho de los factores que uno desee considerar, y también de los criterios de agrupación. Las agrupaciones obtenidas atendiendo solamente a los coeficientes fenéticos de similaridad de la toxina, no son significativos desde el punto de vista evolutivo, puesto que todos los datos son de la misma naturaleza y representan una porción relativamente pequeña de la composición genética. Cuando se relacionan todos los sistemas en una forma apta para un análisis de agrupación (como TAXON) los resultados serán significativos.

Para un resumen visual de las afinidades he encontrado que los gráficos poligonales ideados por Hutchinson (1936) y más tarde usados por Ellison, Alston y Turner (1962), son muy útiles (Fig. 8). Cada radio representa

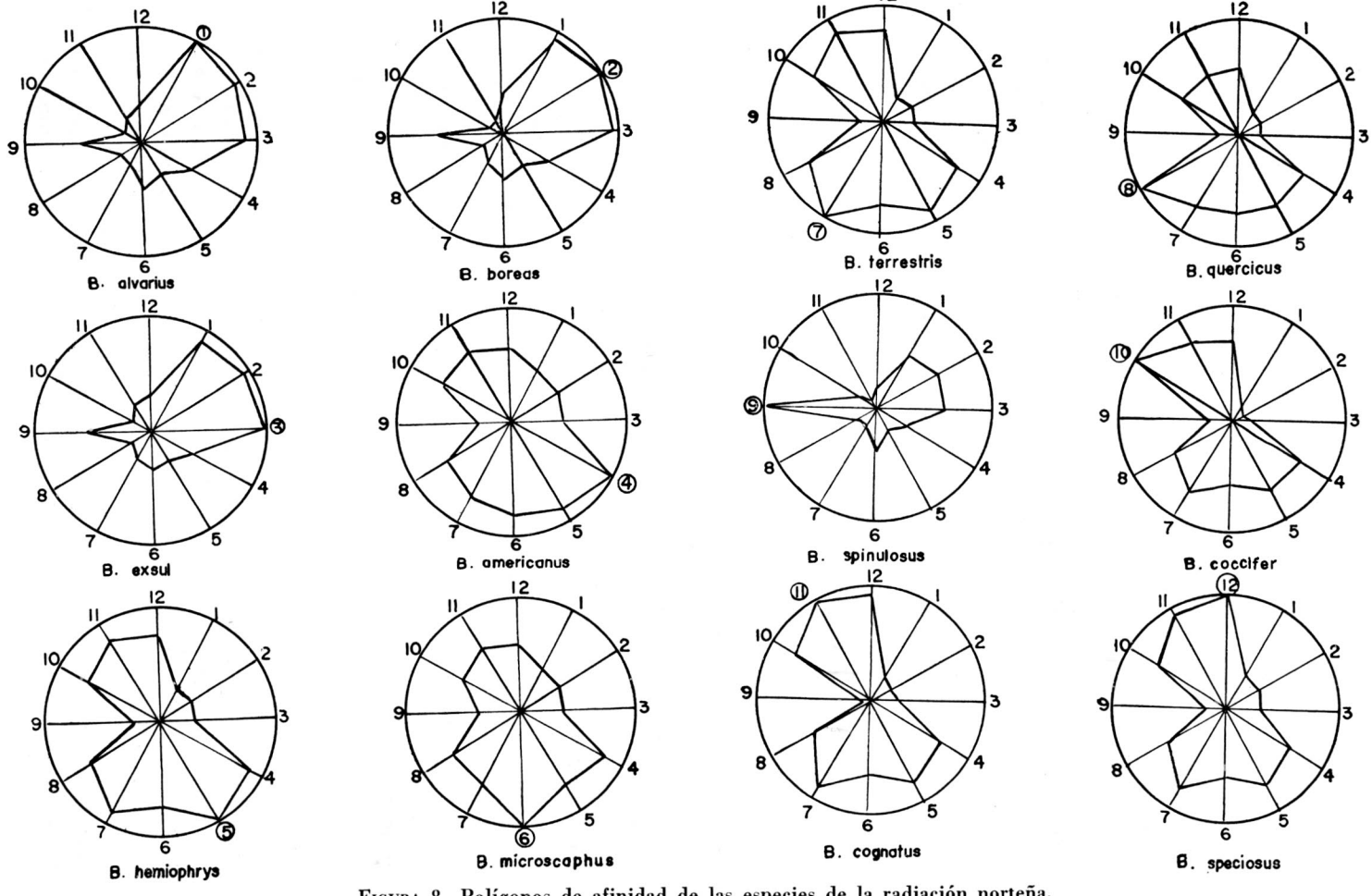


FIGURA 8. Polígonos de afinidad de las especies de la radiación norteña.

una especie o una localidad de la especie. Se representan las afinidades en los radios apropiados desde cero (en el centro del círculo) hasta cien por ciento (en la periferia). Se construye un polígono para cada especie. El coeficiente de afinidad para cada especie será cien por ciento puesto que un radio representa la afinidad de esa especie consigo misma. Si dos polígonos son similares en forma pero no en extensión, es probable que esto indique una relación más firme entre estas dos especies que si los polígonos fueran de extensión comparable pero de forma distinta.

Otra técnica que puede ser útil, particularmente cuando se compara un gran número de especies o grupos de especies, es la técnica del promedio de las afinidades entre los grupos. Este es simplemente el promedio de las afinidades entre todas las especies de dos grupos. Para un resumen gráfico de esta clase de datos, es preferible el diagrama en forma de "telaraña" (Figura 9).

Correlación entre las características bioquímicas y la evolución de Bufo:

Las excelentes pruebas cualitativas de Cei y otros (1968 b), y las mías, sugirieron varias indicaciones evolutivas dentro del género *Bufo*, las cuales añadidas a otras pruebas hacen posibles algunas generalizaciones. La evidencia más persuasiva indica los trópicos Americanos como el origen geográfico del género. Por cierto, ésta es la zona en que se encuentra más variedad en las modalidades de toxina, y algunos participantes presentes en este simposio han comprobado este punto para otros sistemas. Las especies con características que se consideran primitivas o más generalizadas se encuentran en los trópicos Americanos y en Africa (Fig. 10). El tipo primitivo de toxina contiene 5-hidroxitriptamina, pero carece de otros indoles como la bufotenina que necesita porteriores sistemas de síntesis. La toxina de tipo primitivo se encuentra en los grupos *valliceps* y *guttatus* de las Américas, y los grupos *mauritanicus, regularis* y *gariepiensis de Africa* (Fig. 10). Una radiación adaptativa muy similar a las especies mencionadas, posee 5-hidroxitriptamina y bufotenina, en las especies sudamericanas *B. marinus, B. paracnemis, B. arenarum* y *B. crucifer*.

B. melanostictus, una especie asiática, posee esta clase de toxina y quizás esté relacionada, bien sea con esta línea, o con la de *valliceps*.

Los grupos *spinulosus, boreas, alvarius* y *punctatus* (Americanos) y los grupos *stomaticus, bufo* y *viridis* (europeos y asiáticos) constituyen una línea bioquímica bien definida. Esta parece ser relativamente avanzada. La toxina contiene bufotenina, bufoviridina y otros indoles ausentes en la línea primitiva. Los grupos americanos parecen haber perdido secundariamente la 5-hidroxitriptamina. Los grupos de las especies *americanus* y

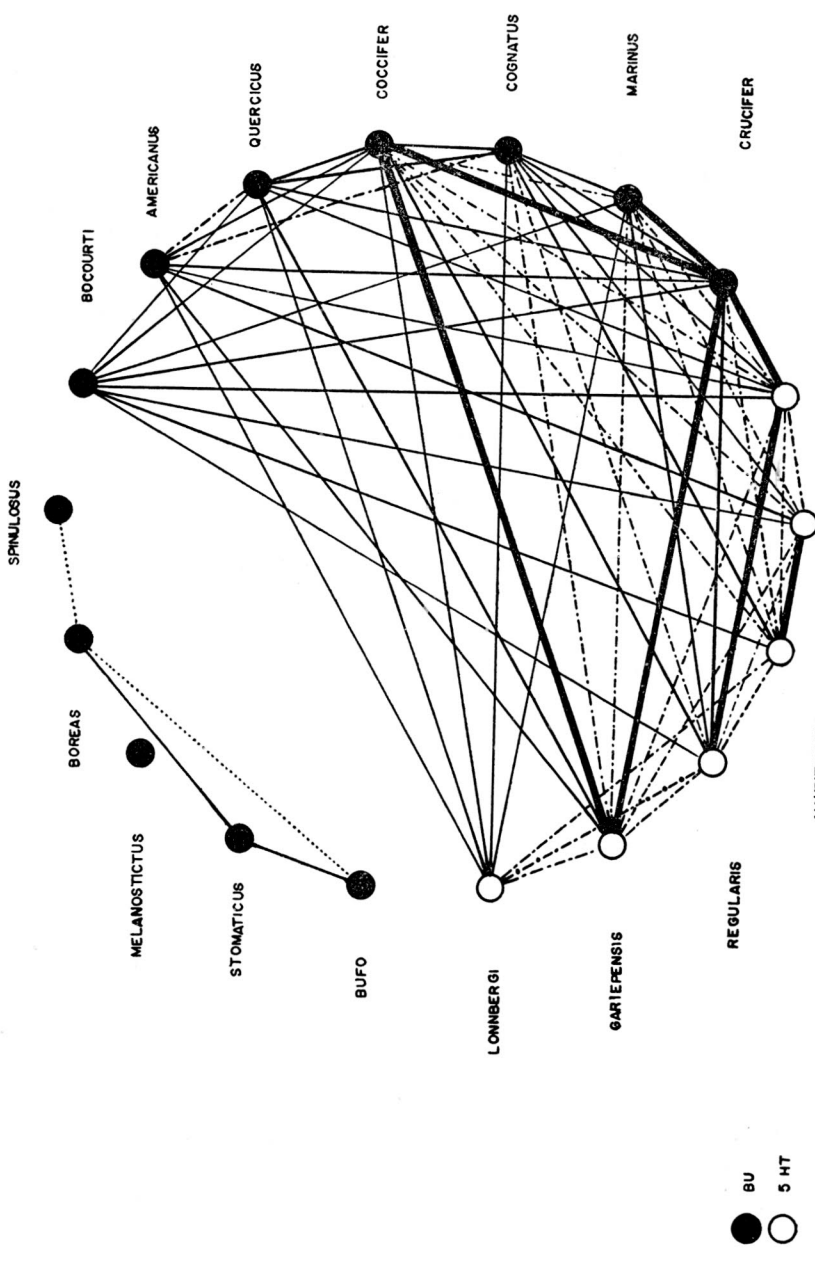


FIGURA 9. Diagrama en forma de "telaraña" de afinidades entre los grupos.

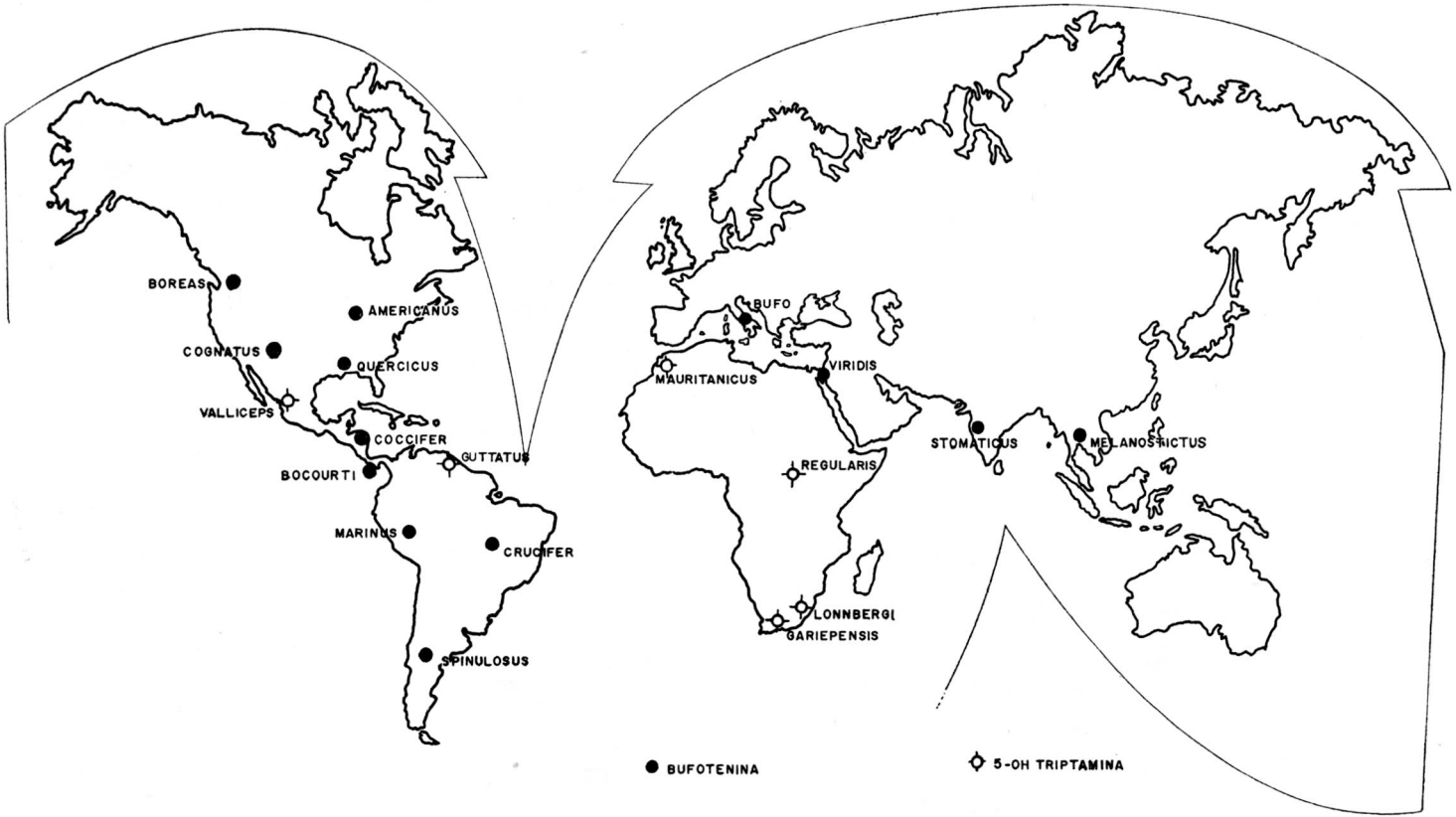


FIGURA 10. Distribución de los grupos de especies examinadas de *Bufo*.

quercicus parecen constituír una derivación de esta línea; ambos grupos tienen una composición tóxica similar a los otros pero han conservado la 5-hidroxitriptamina.

Las especies africanas demuestran altos coeficientes de afinidad con las de la línea evolutiva centroamericana y sudamericana y tienen la misma clase de toxina de los grupos *valliceps* y *guttatus.*

Los datos de afinidad indican otro punto significativo. Según lo ha sugerido Jordan (1905), las especies que presentan una marcada afinidad filogenética, por lo general presentan también una estrecha afinidad geográfica. Así, el estudio de especies que provienen de zonas geográficas distantes y además presentan afinidad filogenética, es muy útil y permite vislumbrar posibles dispersiones remotas.

Algunas de las afinidades intercontinentales más acentuadas se resumen en un diagrama (Fig. 11). Afinidades más destacadas se hallan entre las especies *B. bufo* y *B. viridis,* europeas, y las americanas de los grupos *B. boreas* y *B. alvarius.* Los coeficientes de afinidad alcanzan cuarenta y cinco por ciento en el caso de las especies *B. viridis* y *B. exsul* y cincuenta y dos por ciento en *B. viridis* y *B. alvarius.* Cuando se consideran las especies *B. stomaticus* y *B. spinulosus* la situación resulta más clara. Afinidades entre *stomaticus, bufo* y *viridis* alcanzan sesenta y dos por ciento y cincuenta y ocho por ciento respectivamente. *B. stomaticus* presenta un coeficiente de afinidad que va de sesenta y siete por ciento a setenta y uno por ciento con los grupos *boreas* y *alvarius.* Estos presentan con *B. spinulosus* coeficientes de afinidad de cincuenta y cinco por ciento a sesenta por ciento. Estos datos muestran una serie de eslabones de relaciones (Fig. 11).

Los coeficientes de afinidad de *B. melanostictus* con las especies americanas son menores de 50%; los coeficientes más altos ocurren con el grupo *boreas;* por otra parte la distribución de los compuestos de la toxina muestra semejanzas de *marinus* y *crucifer* con *melanostictus.*

Las afinidades intercontinentales más marcadas se encuentran entre las especies de la radiación suramericana y centroamericana con la africana. De los cuatrocientos coeficientes calculados veintiséis se encuentran entre 50% y 60%; 148 entre 60% y 70%; 161 entre 70 % y 80%; 53 entre 80% y 90% y dos mayores de noventa por ciento. No hay coeficiente inferior a 50%, si se excluye *B. spinulosus,* relacionado con la línea nórdica, según se ha demostrado.

La relación cromatográfica de las especies europeas y asiáticas es sorprendente especialmente en vista de los esquemas de origen y dispersión basados sólo en la morfología conforme el trabajo de Darlington (1957). Si los bufónidos se originaron en la zona tropical africana y si la dispersión fue radial desde este punto, los coeficientes de afinidad debieron ser más altos entre las especies de zonas del Viejo Mundo. En efecto, entre las

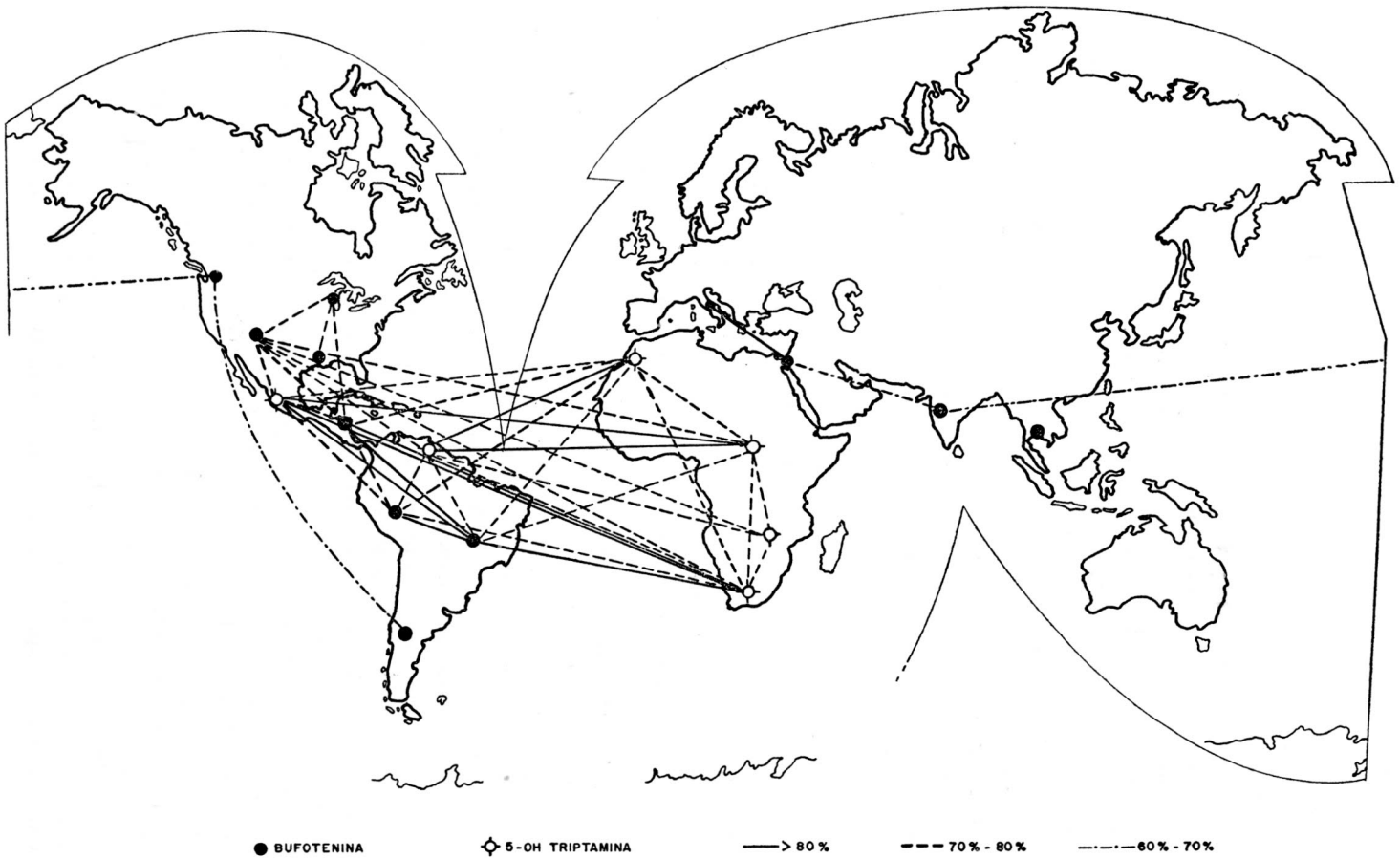


FIGURA 11. Diagrama de los altos coeficientes de afinidad intercontinentales.

Reference		arenobufagin	argentinogenin	bufalin	bufarenogenin	bufotalin	bufotalidin	bufotalinin	cinobufagin	cinobufotalin	gamabufotalin	hellebrigenol	jamacobufagin	marinobufagin	resibufagin	telocinobufagin	"Bufagins A,B,C"	gamma sitosterol	desacetyl-bufotalin	desacetyl-cinobufagin	desacetyl-cinobufotalin
1/	B. alvarius						1														
2/	B. arenarum	3					2	2			1			2		2					
3/	B. arenarum	0.67	0.28	0.33	0.21		0.46	0.24				0.24		1.57	0.42	0.61					
1/	B. blombergi																				
2/	B. b. bufo					3	2	1						2		1					
4/	B. b. bufo					4.50	0.58	0.53						1.5		0.31					
5/	B. b. bufo					+	+							+		+					
2/	B. b. formosus	1		(+)							1			2	(+)	1					
6/	B. b. formosus	+	+	+		+	+	+	+	+	+			+	+	+			+	+	+
2/	B. marinus						1				1	1		3		2					
7/	B. marinus		0.01	0.7			0.06				0.02	0.02	0.07	1.00							
2/	B. mauritanicus						1	1						1	3						
8/	B. mauritanicus	+		2.0			0.1	0.1						1.00	+	+					
9/	B. mauritanicus			+			+	+						+	+						
10/	B. melanostictus																+				
11/	B. melanostictus			(+)		+	+							+	(+)						
12/13/	B. paracnemis		+	+			+	+			+	+			+	+		+			
14/	B. regularis	+									+										
2/	B. regularis (Erythrea)	(+)					2	3				1		1	2						
2/	B. regularis (SW Afr.)	2					2	3				1		1	2						
2/	B. regularis skin	2									1				1						
1/	B. spinulosus	1									1				1						
2/	B. spinulosus	2						(+)			2			2	2	1					
1/	B. valliceps	2					1					1		3		2					
1/	B. val. skin	1												1		1					
15/	Ch'an Su	+		1.25+		0.6-	0.17+		1.0-	1.0-	.85-				1.7-	0.5-			0.10-	0.3-	0.12+
				1.5		0.8	0.2		1.2	1.2	1.0				2.0	0.6			0.15	0.4	0.15

LISTA 1. Lista de la ocurrencia de las bufadienolidas en *Bufo*, resumida de la literatura.

CONVENCIONES: 1. Presente en pequeñas cantidades. 2. Presente en moderadas cantidades. 3. Presente en grandes cantidades. + Presente, cantidad no especificada. (+) Probablemente presente, identificación tentativa. Si se dan cifras decimales, representan porcentaje de veneno identificado como compuesto.

REFERENCIAS

1. Barbier *et al.*, 1961. 2. Schröter, Tamm, Reichstein and Deulofeu, 1958. 3. Schröter, Tamm and Reichstein, 1958a. 4. Schröter, Tamm and Reichstein, 1958b. 5. Urscheler *et al.*, 1955. 6. Iseli *et al.* 1965. 7. Barbier *et al.*, 1959. 8. Linde and Meyer, 1958. 9. Bolliger and Meyer, 1957. 10. Van Gils, 1938. 11. Iseli *et al.*, 1964. 12. Zelnik and Ziti, 1962. 13. Zelnik *et al.*, 1964. 14. Bharucha *et al.*, 1961. 15. Ruckstall and Meyer, 1957.

| | | |

especies africanas y del Medio Oriente existe una nítida diferencia bien sea en el tipo de toxina, bien sea en la afinidad. Los más altos coeficientes de afinidad entre las varias especies africanas y euroasiáticas que se han examinado, fueron los coeficientes de *B. viridis* y *B. rangeri* (cuarenta y cinco por ciento). Es obvio al apreciar los altos coeficientes de afinidad entre las especies africanas y del Nuevo Mundo y la aparente falta de afinidad entre las especies africanas y euroasiáticas, que hay una urgente necesidad de examinar más ejemplares de las especies asiáticas.

La figura 8 representa un resumen de las afinidades bioquímicas entre los grupos. Las especies de los grupos *valliceps* y *guttatus* indican marcadas afinidades con los grupos *regularis* y *mauritanicus*. Las tendencias que se notan en los coeficientes de afinidad a nivel de grupo confirman las que hemos deducido en términos de las especies individualizadas. Hay pronunciadas afinidades entre los grupos *valliceps*, *crucifer* y *marinus* (incluso *arenarum)* de la radiación sudamericana y centroamericana y entre éstos y los grupos de las especies africanas. Los grupos *bufo* (y *viridis)*, *stomaticus* y *boreas* presentan afinidades. Grupos de especies que se encuentran en una posición intermedia cualitativamente entre las líneas septentrional y meridional del Nuevo Mundo, como *coccifer* y *cognatus*, presentan altos coeficientes con los grupos de ambas líneas.

En resumen, vemos que el uso de las secreciones cutáneas ha resultado ser un instrumento valioso en una familia de anfibios, cuando menos, y muchos problemas intrigantes esperan todavía su solución.

OBRAS CITADAS

Alston, R. E., y B. L. Turner, 1963. *Biochemical Systematics*, Prentice-Hall, New York. 403 p.

Anastasi, A. V. Erspamer, y R. Endean. 1968. Isolation and amino acid sequence of caerulein, the active decapeptide of the skin of *Hyla caerulea*. *Arch. Biochem. Biophys. 125 (1):* 57-67.

Anastasi, A., V. Erspamer, y G. Bertaccini. 1965. Occurrence of bradykinin in the skin of *Rana temporaria*. *Comp. Biochen. Phisiol. 14:* 43-52.

Barbier, M., M. Barucha, K. K. Chen, V. Deulafeu, E. Iseli, H. Jaeger, M. Kotake. R. Rees, T. Reichstein, O. Schindler, y E. Weiss. 1961. Papierchromatographische Prüfung weiterer Krotensekrete. *Helv. Chim. Acta 44:* 362-367.

Barbier, M., H. Schroter, K. Meyer, O. Schindler, y T. Reichstein. 1959. Die Bufogenine des Parotoidsekretes von *Bufo marinus* (L.) Schindler. *Helv. Chim. Acta 42:* 2486-2505.

Barucha, M., K. K. Chen, E. Weiss, y T. Reichstein. 1961. Regularobufagin. *Helv. Chim. Acta 44:* 844-846.

BLAIR, A. P. 1942. Isolating mechanisms in a complex of four species of toads. *Biol. Symp. 6:* 235 - 249.

BLAIR, W. F. 1956. Call difference as an isolating mechanism in south-western toads (genus *Bufo). Texas J. Sci. 8:* 87 - 106.

BLAIR, W. F. 1956b. The mating call of hybrid toads. *Texas J. Sci. 8:* 350 - 355.

BLAIR, W. F. 1958. Mating call in the speciation of anuran amphibians. *Amer. Naturalist 92:* 27 - 51.

BLAIR, W. F. 1962. Non-morphological data in amphibian classification. *Systematic Zool. 11 (2):* 72 - 84.

BOLLIGER, ROSMARY, y KUNO MEYER. 1957. Isolierung und Identifizierung der Steroide des Giftesekretes der Berberkröte (Pantherkröte) *Bufo mauritanicus* L. *Helv. Chim. Acta 40:* 1659 - 1670.

CEI, J. M., y V. ERSPAMER. 1966. Biochemical taxonomy of South American amphibians by means of skin amines and polypeptides. *Copeia 2:* 74 - 78.

CEI, J. M., V. ERSPAMER, y M. ROSEGHINI. 1968. Taxonomic and evolutionary significance of biogenic amines and polypeptydes occurring in amphibian skin. I. Neotropical leptodactylid frogs.

CEI, J. M., V. ERSPAMER, y M. ROSEGHINI. 1968. Taxonomic and evolutionary significance of biogenic amines in amphibian skin. II. Toads of genera *Bufo* and *Melanophryniscus. Systematic Zool.*

CHEN, K. K. and A. L. CHEN. 1933a. Notes on the poisonous secretions of twelve species of toads. *J. Pharm. Exp. Ther. 47 (3):* 281 - 293.

CHEN, K. K. and A. L. CHEN. 1933b. The physiological activity of the principles isolated from the secretion of the common European toad *(Bufo bufo bufo). J. Pharm. Exp. Ther. 47:* 307 - 320.

CHEN, K. K. and A. L. CHEN. 1933c. The physiological action of the principles isolated from the secretion of the South African Toad *(Bufo regularis). J. Pharm. Exp. Ther. 49:* 503 - 513.

CHEN, K. K. and A. L. CHEN. 1933d. The physiological action of the principles isolated from the secretion of the Jamaican Toad *(Bufo marinus). J. Pharm. Exp. Ther. 49:* 515 - 525.

CHEN, K. K. and A. L. CHEN. 1933e. A study of the poisonous secretions of five North American species of toads. *J. Pharm. Exp. Ther. 49:* 526 - 547.

CHEN, K. K. and A. L. CHEN. 1933f. The parotid (sic) secretion of *B. bufo gargizans* as the source of Ch'an Su. *J. Pharm. Exp. Ther. 49:* 543 - 547.

CHEN, K. K. and A. L. CHEN. 1933g. The active groupings in the molecules of cino —and marino-bufagnis and cino— and vulgaro-bufotoxins. *J. Pharm. Exp. Ther. 49:* 548 - 560.

CHEN, K. K. and A. L. CHEN. 1933h. Similarity and dissimilarity of bufagins, bufotoxins, and digitaloid glucosides. *J. Pharm. Exp. Ther. 49:* 561 - 579.

CURTIS, D. R. y W. C. DE GROAT. 1968. Tetanus toxin and spinal inhibition. *Brain Research 10:* 208 - 212.

DALY, J. W., y C. W. MYERS. 1967. Toxicity of Panamian Poison Frogs *(Dendrobates):* some biological and chemical aspects. *Science 156 (3777):* 970 - 973.

DARLINGTON, PHILIP J. 1957. *Zoogeography: the geographical distribution of animals.* John Wiley & Sons, Inc. New York. 674 p.

DE LILLE, J. 1934, in *An. Inst. Biol. 5:* 232.

DEULOFEU, V., E. DUPRAT, y R. LABRIOLA. 1940. Acetyl content of marinobufagin, arenobufagin, and acetyl-marinobufagin. *Nature 145:* 671.

ELLISON, W. L., R. E. ALSTON, y B. L. TURNER. 1962. Methods of presentation of crude biochemical data for systematic purposes, with particular reference to the genus *Bahia* (compositae). *Amer. J. Bot. 49 (6):* 599 - 604.

ERSPAMER, V. 1954. Pharmacology of indolealkylamines. *Pharmacol. Rev. 6:* 425 - 487.

ERSPAMER, V., G. BERTACCINI, y J. M. CEI. 1962. Occurrence of bradykinine-like polypeptides in the amphibian skin. *Experientia 18:* 563 - 564.

ERSPAMER, V., M. ROSEGHINI, y J. M. CEI. 1964. Indole-, imidazole-, and phenyl-alkylamines in the skin of thirteen *Leptodactylus* species. *Biochem. Pharmacol. 13:* 1083 - 1093.

ERSPAMER, V., T. VITALI, M. ROSEGHINI, y J. M. CEI. 1964. The identification of new histamine derivatives in the skin of *Leptodactylus. Arch. Biochem. Biophys. 105:* 620 - 629.

GOTO, T. 1963a. Fluoreszierender Stoff aus *Bufo vulgaris.* Konstitution-saurfklärung des Pteridines "Bufo-chrome". *Japan, J. Zool. 14 (1):* 91 - 95.

GOTO, T. 1963b. Über einen blau fluoreszierenden Stoff "Bufo-chrome", seine isolierung aus der Haut einer Krote *Bufo vulgaris* und seine Verhalter in der Entwiklungsstadien. *Japan. J. Zool. 14 (1):* 83 - 90.

HUNSAKER, DON II, R. E. ALSTON, W. F. BLAIR, y B. L. TURNER. 1968. A comparison of the ninhydrin-positive and phenolic substances of parotoid gland secretions of certain *Bufo* species and their hybrids. *Evolution 15:* 352 - 359.

HUTCHINSON, A. H. 1936. The polygonal presentation of polyphase phenomena. *Trans. Royal. Soc. Canada, Ser. 3, Sect. 5 (66):* 19 - 26.

ISELI, E., M. KOTAKE, E. WEISS, y T. REICHSTEIN. 1965. Die sterine und Bufadienolide der Haut von *Bufo formosus* Boulenger. *Helv. Chim. Acta 48:* 1093 - 1112.

ISELI E., E. WEISS, T. REICHSTEIN, y K. K. CHEN. 1964. Papierchromatographische Prüfung der Sekrete von *Bufo melanostictus* Schneider und *Bufo asper* Gravenhorst. *Helv. Chim Acta 47:* 116 - 119.

JENSEN, H., y E. A. EVANS, JR. 1934. Chemical studies on toad venoms. VI Ch'an Su, the tried venom of the Chinese Toad, and the secretion of the Tropical Toad, *Bufo marinus. J. Biol. Chem. 104:* 307 - 316.

JORDAN, D. S. 1905. The origin of species through isolation. *Science 22:* 545 - 562.

KISS, G., y H. MICHL. 1962. Über das Giftsekrete de Gelbbauchunke *Bombina Variagata* L. *Toxicon 1:* 33 - 39.

KOTAKE, M., y K. KUWADA. 1937. *Chem. Zentre. 1939:* 1588.

KOTAKE, M., y K. KUWADA. 1939. *Chem. Zentr. 1939:* 1681.

KOTAKE, M., y K. KUWADA. 1942. *Chem. Abstr. 41.*

LOW, BOBBI S. 1967. Evolution in the genus *Bufo:* Evidence from parotoid gland secretions. *Ph. D. Dissertation,* University of Texas. 225 p. Univ. Microfilms, Ann. Arbor, Mich.

LOW, BOBBI S. 1968. Venom polymorphism in *Bufo regularis. Comp. Biochem. Physiol. 26:* 247 - 257.

MANSKE, R. H. F. 1954. The alkaloids of papaveraceous plants. L. *Dicranostigma lacturoides* and *Bacconia piercei* Hutchinson. *Canadian J. Chem. 32:* 83 - 85.

MAYR, ERNST. 1964. The new systematics, p. 13 - 32. En Charles A. Leone (editor). *Taxonomic biochemistry and serology.* Ronald Press, New York. 728 p.

MICHL, H. y E. KAISER. 1963. Chemie und Biochemie der Amphibiengifte. *Toxicon 1:* 175 - 228.

MOORE, JOHN A. 1951. Hybridization and embryonic temperature studies of Rana temporaria and Rana sylvatica. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 37 (12):* 862 - 866.

MOSHER, H. S., F. A. FUHRMAN, H. D. BUCHWALD, y H. G. FISCHER. 1964. Tarichotoxin-Tetrodotoxin: a potent neurotoxin. *Science 144:* 1100 - 1110.

PORTER, KEN R. 1964. Chromatographic comparisons of the parotoid gland secretions of six species in the *Bufo valliceps* group, p. 451 - 456. *En* Charles A. Leone (editor). *Taxonomic biochemistry and serology.* Ronald Press, New York. 728 p.

PORTER, KEN R. 1968. Evolutionary status of a relict population of *Bufo hemiophrys* Cope. *Evolution 22 (3):* 583 - 594.

PORTER, KEN R. y WENDY PORTER. 1967. Venom comparisons and relationships of twenty species of New World toads *(genus Bufo).* Copeia *1967 (2):* 298 - 307.

REES, R., O. SCHINDLER, V. DEULOFEU, y T. REICHSTEIN. 1959. Die Bufogenine des Parotoidsekretes von *Bufo arenarum* Hensel. *Helv. Chim. Acta 42:* 2400 - 2418.

RYCKSTUHL, JEAN - PIERRE, y K. MEYER. 1957. Isolierung und Aufteilung der chloroformlösichen Bestandteile chinesischen Krötengifteroge Ch'an Su. *Helv. Chim. Acta 40:* 1270 - 1292.

SAWAYA, P. 1940. Univ. Sao Paulo Fac. filas cien. y letras zool. *19:* 207.

SCHOEPF, C. and O. W. MÜLLER. 1960. Über samandarin und verwandte alkaloide, VI. (Cycloneosamandion, ein neues nebenalkaloid aus dem feuersalamander *(Salamandra marulosa laver). Justus Liebigs Annalen Der Chemie: 633,* 127 - 155.

SCHRÖTER, H., C. TAMM, T. REICHSTEIN, y V. DEULEFEU. 1958. Über as Vorkommen von Bufotalin. *Helv. Chim. Acta 41:* 140 - 151.

SMITH, IVOR (editor). 1963. Chromatographic and electrophoretic techniques. Vol. I. Paper chromatography. Ed. segundo. Interscience Publishers, New York. 615 p.

URSCHELER, H. R., C. TAMM, y T. REICHSTEIN. 1955. Die Giftstoffe der europaischen Erdkrote *Bufo bufo bufo* L. *Helv. Chim. Acta 38:* 883 - 905.

VAN GILS, G. E. 1938. Chemical composition of the parotid (sic) secretion of *Bufo melanostictus. Acta Brevia Neerland Physiol. Pharmacol. Microbiol. 8:* 84.

VOLPE, E. PETER. 1952. Physiological evidence for natural hybridization of *Bufo americanus* and *B. fowleri. Evolution 6:* 393 - 406.

WIELAND, H., y G. HESSE. 1935. *Ann. Chem. Liebigs 517:* 22.

WIELAND, H., G. HESSE, y R. HÜTTEL. 1936. *Ann. Chem. Liebigs 524:* 203.

WITTLIFF, JAMES L. 1962. Parotoid gland secretions in two species groups of toads. *Evolution 16:* 143 - 153.

WITTLIFF, JAMES L. 1964. Venom constituents of *Bufo fowleri, Bufo valliceps,* and their natural hybrids analysed by electrophoresis and chromatography, p. 457 - 464. *En* Charles A. Leone (editor), *Taxonomic biochemistry and serology.* Ronald Press, New York, 728 p.

ZELNIK, R., y L. M. ZITI. 1962. Thin layer chromatography: chromatoplate analysis of the bufadienolides isolated from toad venom. *J. Chromatography 9:* 371 - 373.

ZELNIK, R., L. M. ZITI, y C. V. GUIMARAES. 1964. A chromatographic study of the bufadienolides isolated from the parotid (sic) glands of *Bufo paracnemis* Lutz 1925. *J. Chromatography 15:* 9 - 14.